

## 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的真核表达及对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

王欢<sup>1</sup>, 刘琼琼<sup>2</sup>, 唐小军<sup>2</sup>, 徐鑫<sup>1</sup>, 褚楚<sup>3</sup>, 熊四平<sup>2</sup>, 郑峰<sup>4</sup>, 童华<sup>3</sup>, 朱进<sup>4</sup>, 冯振卿<sup>1,2\*</sup>, 林红<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013; <sup>2</sup>南京医科大学病理学系, 卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>南京医科大学附属南京妇幼保健院妇科, 江苏 南京 210004; <sup>4</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的: 以人源抗 TROP2 抗体 Fab 基因为模板, 构建人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统, 观察人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对胰腺癌细胞增殖的抑制作用。方法: 分别扩增抗 TROP2 抗体的重链和轻链基因, 构建人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的重组表达载体 pWS-anti-TROP2, 转染 CHO dhfr-细胞, 加 MTX 筛选抗体表达量高的单克隆株, Protein G 亲和柱纯化, 获得人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG。SDS-PAGE、Western blot、ELISA、免疫荧光和流式细胞术等方法鉴定人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 并分析其免疫学活性。MTT 法分析人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对胰腺癌细胞 BxPC-3 的增殖抑制作用。结果: 成功构建了人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的真核表达系统, 表达并纯化人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG。经鉴定, 抗体的轻链与重链大小与预期一致, 可与 TROP2 蛋白特异性结合, 效价可达 1:6 400。MTT 检测结果表明, 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对胰腺癌 BxPC3 细胞的增殖有明显的抑制作用, 且呈时效、量效依赖关系。结论: 本研究成功构建了人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的真核表达系统, 并证明此抗体可特异性识别胰腺癌细胞表面的 TROP2 蛋白, 且对胰腺癌细胞的增殖有明显的抑制作用。

**[关键词]** TROP2; 真核表达系统; CHO dhfr-细胞; 胰腺癌

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)07-863-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140703

## Eukaryotic expression of human anti-TROP2 antibody IgG and its inhibitory effect on cell proliferation of pancreatic cancer

Wang Huan<sup>1</sup>, Liu Qionqiong<sup>2</sup>, Tang Xiaojun<sup>2</sup>, Xu Xin<sup>1</sup>, Chu Chu<sup>3</sup>, Xiong Siping<sup>2</sup>, Zheng Feng<sup>4</sup>, Tong Hua<sup>3</sup>, Zhu Jin<sup>4</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>, Lin Hong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; <sup>2</sup>Department of Pathology, Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Gynecology, Nanjing Maternal and Child Care Hospital, NJMU, Nanjing 210004; <sup>4</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a eukaryotic expression system of human anti-TROP2 antibody IgG by using human anti-TROP2 Fab antibody gene as template, so as to study its inhibition of pancreatic cancer cell proliferation. **Methods:** The recombinant expression vector of human anti-TROP2 antibody IgG, named as pWS-anti-TROP2, was established by amplifying the heavy chain and light chain genes of human anti-TROP2 antibody IgG, respectively. pWS-anti-TROP2 plasmids were transfected into CHO dhfr- cell lines, and the monoclonal cell strains with high antibody expression were harvested by MTX screening. Then, human anti-TROP2 antibody IgG was obtained using Protein G affinity purification. The identification and immunological characteristics of the human anti-TROP2 antibody IgG were analyzed by several methods, including sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Western blotting assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), flow cytometry method (FCM) and immunofluorescence assay. The inhibition function of human anti-TROP2 antibody IgG in proliferation of BxPC3 cells was analyzed by MTT assay. **Results:** The eukaryotic expression system of human anti-TROP2 antibody IgG was constructed successfully. Purified human

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81101704); 南京市医学科技发展项目(ZKX12025)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn, linhong712003@sina.com

anti-TROP2 antibody IgG was obtained. The molecular weight of light and heavy chains of human anti-TROP2 antibody IgG are consistent with expected results, the antibodies could bind to TROP2 protein specifically, and the antibody titer reached 1:6 400. MTT assay demonstrated that human anti-TROP2 antibody IgG played a significant role in inhibiting BxPC3 cell proliferation, and the inhibition ratio was gradually increased with prolonged time and increased antibody dose. **Conclusion:** In the study, the eukaryotic expression system of human anti-TROP2 antibody IgG was established successfully, and it was proved that the antibody could recognize native TROP2 protein on pancreatic cancer cell surface specifically and play an important role in inhibiting the proliferation of pancreatic cancer cells.

[Key words] TROP2; eukaryotic expression system; CHO dhfr- cell line; pancreatic cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 863-869, 882]

胰腺癌是人类常见的高度恶性肿瘤,其发病机制仍不清楚,涉及多个基因突变及表达异常<sup>[1-3]</sup>。有研究报道人滋养层细胞表面抗原-2 (trophoblast cell-surface antigens 2, TROP2)的高表达与胰腺癌的发生发展相关,TROP2 定位于 1p32 区域,是无内含子基因,所编码的产物为含 323 个氨基酸、分子量 35 700 的蛋白质<sup>[4-5]</sup>。它是一个单次跨膜糖蛋白,在正常上皮组织中很少表达或不表达,但在滋养细胞及多种上皮癌中高表达。研究表明,TROP2 与多种肿瘤的侵袭行为密切相关,具有促进肿瘤细胞侵袭和转移的功能<sup>[6]</sup>。因此,TROP2 可能成为一种新的肿瘤预后标志物,并成为肿瘤靶向治疗的潜在靶点<sup>[7-8]</sup>。本文在本实验室已制备的抗 TROP2 Fab 抗体基础上<sup>[9-11]</sup>,构建人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达载体,在 CHO dhfr- 细胞中表达,并观察其与胰腺癌细胞表面 TROP2 蛋白的特异性结合及对胰腺癌细胞增殖的抑制作用,为胰腺癌的靶向治疗奠定基础<sup>[12]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

中国仓鼠卵巢细胞细胞系 CHO dhfr-、胰腺癌细胞系 BxPC-3 由本实验室保存。pT-CH23 质粒、抗 TROP2 抗体 Fab 基因、pWS-2 真核表达系统由本实验室构建并保存。F12、DMEM 培养基、新生胎牛血清购自美国 Gibco 公司。*E.coli*.XL1-Blue、0.25%胰酶 EDTA、100×青/链霉素(双抗)购自美国 Invitrogen 公司。兔抗人 IgG 购自武汉博士德生物有限公司,HRP 标记抗人 Fab、HT 和 MTX 购自美国 Sigma 公司,重组人 TROP2 蛋白购自美国 R&D 公司,内切酶 *Nhe* I、*Mlu* I、*Not* I、*Eco*R I 和 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司。过氧化物酶底物显示液(TMB)购自美国 Pierce 公司,DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司,DNA Transfection Reagent 购自瑞士 Roche 公

司,0.22 μm 滤器、超滤管(30 K)购自美国 Millipore 公司,Protein G (5 ml)亲和柱购自美国 GE 公司,质粒纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,细胞培养瓶、96 孔酶标板购自美国 Corning 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统的构建

以本实验制备的抗 TROP2 抗体 Fab 基因为模板,PCR 扩增抗体的轻链基因和 Fd 基因,以 pT-CH23 质粒为模板扩增抗体的稳定区基因 CH2-CH3 片段,引物序列见表 1。凝胶电泳,紫外下切胶回收,*Eco*R I 与 *Not* I 双酶切 Fd 基因与 CH2-CH3 片段,凝胶电泳,切胶回收,T4 连接酶连接酶切产物,转化感受态 *E.coli*.XL1-Blue,挑单克隆菌株摇菌,PCR 检测,取阳性克隆提取重组质粒,送公司测序。以上述测序正确的 Fd 和 CH2-CH3 质粒为模板,经 Overlap PCR 扩增重链基因,1%凝胶电泳后,切胶回收。

将表达载体 pWS-2 与轻链基因片段以 *Nhe* I 和 *Mlu* I 双酶切,连接后转化 *E.coli*.XL1-Blue 感受态。挑单克隆菌株摇菌,菌液 PCR,取阳性克隆提取重组质粒,送公司测序,命名为 pWS-L。将测序正确的载体 pWS-L 与重链基因片段,*Not* I 和 *Eco*R I 双酶切,回收相应片段,连接后转化 *E.coli*.XL1-Blue 感受态。挑单克隆菌株摇菌,菌液 PCR,取阳性克隆提取重组质粒,送公司测序,测序正确即为人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的重组表达载体,命名为 pWS-anti-TROP2。

#### 1.2.2 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的表达及纯化 1.2.2.1 真核细胞转染条件的优化

用 pEGFP-C3 质粒转染 CHO dhfr-细胞,观察不同质粒 DNA 量(μg)与转染试剂 Lipofectamine 2000 体积(μl)的比值对转染效率的影响。将  $1 \times 10^6$  个 CHO dhfr-细胞种植于 24 孔板中,待细胞贴壁、变形

表 1 PCR 所用引物序列  
Table 1 The sequences of primers used in PCR

目的基因	引物序列
轻链基因	Forward 5'-GCTAGCGCCGCCACCATGGACATGCGGGTTCCAGCCCAGTTCTCGGACTTCTG CTGTTGTGGCTGCGCGAGCAGCGGTGCGAGCTCCAGATGACCCAG-3' Reverse 5'-ACGCGTCTAACACTCTCCCTGTTGAAGCTC-3'
Fd 基因片段	Forward 5'-GAATTCGCGCCACCATGGAGTTCGGACTCAGTTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATC CTGAAGGGTGTGCAGTGTGAGTTCAGGTGCAGCTGGTGGAG-3' Reverse 5'-GGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCACAAGATTTGGGC-3'
CH2-CH3 基因片段	Forward 5'-GCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCC-3' Reverse 5'-GCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGG-3'
OverlapPCR 扩增 H 链基因	Forward 5'-GAATTCGCGCCACCATGGAGTTCGGACTCAGTTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATC CTGAAGGGTGTGCAGTGTGAGTTCAGGTGCAGCTGGTGGAG-3' Reverse 5'-GCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGG-3'

后进行转染。将质粒 DNA( $\mu\text{g}$ )与转染试剂( $\mu\text{l}$ )的比值分别设置为 1:1、1:2、1:3、1:4 4 个实验组,转染 24 h 后更换培养基,48 h 后观察 4 个不同比值的荧光强度,得质粒 DNA( $\mu\text{g}$ )与转染试剂( $\mu\text{l}$ )的最适比例。

1.2.2.2 重组真核表达载体转染 CHO dhfr-细胞,筛选表达量最高的单克隆株

按上述优化条件,将 pWS-anti-TROP2 质粒转染 CHO dhfr-细胞,24 h 换新鲜培养基,对转染细胞逐渐加压 (MTX:25、50、100、200 nmol/L)筛选,当有克隆形成时,消化细胞,铺 96 孔板,2 周后,形成克隆,吸取上清检测抗体的表达量,表达量高者扩大培养。

1.2.2.3 重组真核表达系统分泌抗体的纯化

大量培养上述表达量高的单克隆细胞,待培养瓶中长至 70%~80%时,换无血清培养基,培养至细胞全部死亡。收集上清,离心去沉淀,用 0.22  $\mu\text{m}$  针式过滤器滤去杂质和细菌。用 Protein G HP 亲和层析柱纯化上清,得人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG。检测蛋白浓度,分装标记,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.3 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的鉴定与免疫学功能分析

1.2.3.1 SDS-PAGE

配置 10%分离胶;计算人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 含量,按每孔 2  $\mu\text{g}$  上样,做 SDS-PAGE 分析。

1.2.3.2 Western-blot

配置 10%分离胶;计算人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 含量,按每孔 2  $\mu\text{g}$  上样,做 Western blot 分析。二抗为 HRP 抗人 Fab,用 5%脱脂奶粉 1:1 000 稀释。

1.2.3.3 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 效价分析

将上述纯化所得人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 做 ELISA 分析。用重组人 TROP2 蛋白(0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )包被 ELISA 板 (50  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜);5%奶粉封闭 (300  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜);加入兔抗人 IgG(1:200 稀释)二次封闭 (20  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  1 h);加入纯化的梯度稀释 (1:100~1:6 400)的抗体,以未转染细胞上清 (1:100~1:6 400)为空白(阴性)对照,放置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;加入 HRP 标记的抗人 Fab(1:4 000),放置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;加入 TMB 底物显色,室温 20 min 后,加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,酶标仪读数测定  $D(450\text{ nm})$ 的吸光值显色。

1.2.3.4 流式细胞术检测

取 BxPC3 和 NIH3T3 细胞各  $2 \times 10^6$  个;用 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗涤 3 次;分别加入纯化抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 1.5 h;PBS 洗涤 3 次,1 000 r/min 离心 3 min;加入 100  $\mu\text{l}$  FITC 标记羊抗人 IgG 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,1 000 r/min 离心 3 min;流式细胞仪检测细胞与抗体的结合率。

1.2.3.5 免疫荧光检测

分别培养 BxPC3 和 NIH3T3 细胞于 6 孔板中 ( $2 \times 10^6$  个/孔),培养至 80%面积覆盖;吸去孔中的细胞培养液,PBS 洗涤 2 次,细胞用 1%多聚甲醛固定 30 min 后,再用无菌 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 冲洗 3 次;1% BSA 室温封闭 1 h 后,各孔中加浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  纯化的单抗 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;吸去抗体,用预冷的 PBS 冲洗 3 次;加入罗丹明标记的抗人 Fab(1:200),避光室温孵育 2 h;PBS 冲洗 3 遍;加入 DAPI(1 mg/ml),室温孵育 15 min,PBS 冲洗;荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.4 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对胰腺癌细

胞增殖的抑制作用

在96孔板中培养 BxPC3 与 NIH3T3 细胞,  $1 \times 10^4$  个/孔(4个复孔), 细胞贴壁后, 以 RPMI1640/DMEM 培养液稀释人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG, 按照 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 稀释抗体; 同时以兔抗人 IgG 作为阴性对照抗体; 分别取 100  $\mu$ l 加入培养有 BxPC3 细胞 (RPMI1640 培养液) 和 NIH3T3 细胞 (DMEM 培养液) 的 96 孔培养板中; 继续培养 48 h, 培养结束前 4 h, 向各培养孔加入 MTT(5 mg/ml) 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h, 弃去上清, 每孔加入 10% DMSO 200  $\mu$ l, 振荡器震荡 10 min 后, 用全自动酶标仪检测各孔的光密度, 检测波长 490 nm, 计算抑制率。抑制率(%)=(1-实验组吸光值/对照组吸光值)×100%。

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析法分析全人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对不同靶细胞的生长抑制作用。采用线性相关性分析法分析抗体浓度与靶细胞生长抑制之间的相关性。

2 结果

2.1 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统的构建

PCR 扩增人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统轻链基因、Fd 基因与 CH2-CH3 基因片段, 扩增产物经凝胶电泳鉴定, 结果显示, 轻链基因相对分子量约 750 bp(图 1A), Fd 基因与 CH2-CH3 基因片段相对分子量约为 650 bp(图 1B), 与预期结果相符。扩增产物经测序, 测序结果正确。Overlap PCR 扩增抗体的重链基因, 凝胶电泳结果显示有 1 条相对分子量约 1 300 bp 的目的条带(图 1C), 与预期结果相符。

pWS-2 质粒和轻链基因经双酶切、连接、转化, 构建重组载体 pWS-L, 经测序, 结果均正确。双酶切 pWS-L 和重链基因, 构建重组载体 pWS-anti-TROP2, 测序结果正确。

2.2 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的表达及纯化

2.2.1 真核细胞转染条件的优化

将 pEGFP-C3 质粒( $\mu$ g)与转染试剂( $\mu$ l)按不同比值转染 CHO dhfr-细胞, 48 h 后, 在显微镜下观察不同比值的荧光强度。结果显示, 当质粒( $\mu$ g)与转染试剂( $\mu$ l)的比值为 1:1 时, 转染效率最高(图 2)。

2.2.2 重组真核表达载体转染 CHO dhfr-细胞, 筛选表达量最高的单克隆株

按 pWS-anti-TROP2 真核表达载体( $\mu$ g)与转染试剂 Lipofectamine 2000( $\mu$ l)比值为 1:1 转染 CHO

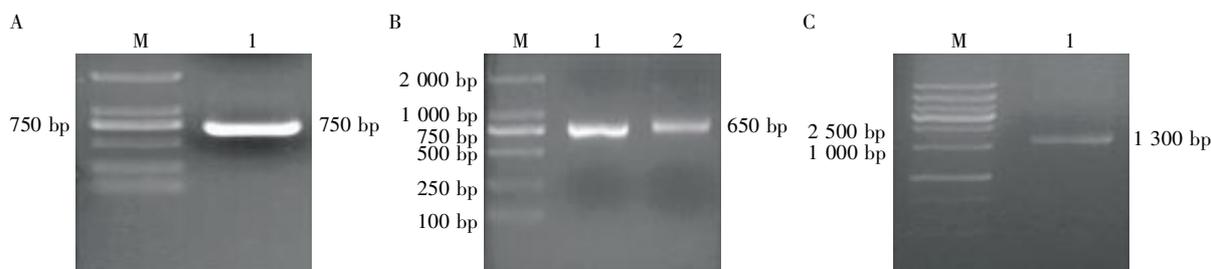
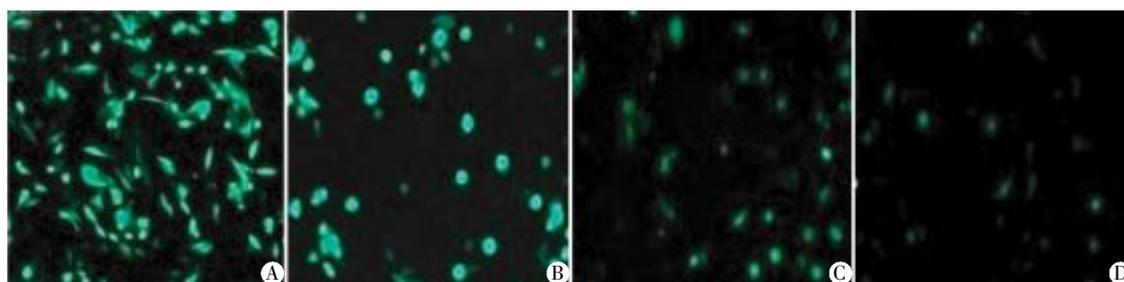


图 1 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统构建中的 PCR 产物

Figure 1 The PCR products of the establishment of the eukaryotic expression system of human anti-TROP2 antibody IgG



A~D: 质粒( $\mu$ g):转染试剂( $\mu$ l)的比值分别为 1:1、1:2、1:3、1:4。

图 2 细胞转染条件的优化

Figure 2 Optimization of cell transfection conditions

dhfr-细胞,对转染细胞逐渐加压 (MTX;25、50、100、200 nmol/L)筛选,当有克隆形成时,吸取上清检测抗体的表达量,选出表达量最高的单克隆株,扩大培养。

### 2.2.3 重组真核表达系统分泌抗体的纯化

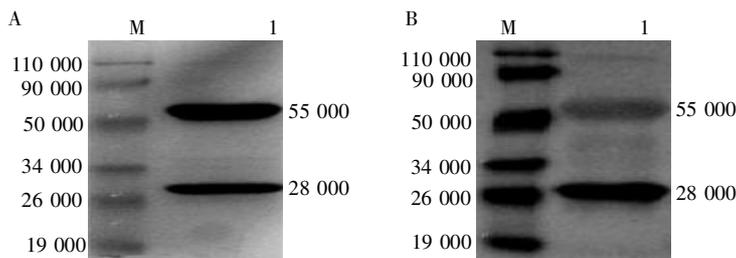
扩大培养表达量高的细胞,收集上清。上清用 Protein G (5 ml)亲和层析柱纯化,纯化后超滤浓缩,获得人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG,测蛋白浓度为

4 mg/ml。

## 2.3 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的鉴定与免疫学功能分析

### 2.3.1 SDS-PAGE 与 Western blot 检测

将抗 TROP2 抗体做 SDS-PAGE 与 Western blot 分析。结果均显示,在 55 000 与 28 000 处有目的条带(图 3)。



A:纯化抗体的 SDS-PAGE 检测;B:纯化抗体的 Western blot 检测;M:marker;1:抗体电泳条带。

图 3 纯化抗体的 SDS-PAGE 检测与 Western blot 检测

Figure 3 SDS-PAGE analysis and Western blot analysis of purified antibody

### 2.3.2 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 效价分析

以重组人 TROP2 蛋白(0.5  $\mu\text{g/ml}$ )包板,用间接 ELISA 法检测人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的效价。结果显示,在 1:6 400 稀释度时,人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 仍可与 TROP2 抗原特异性结合(图 4)。

### 2.3.3 流式细胞术检测

流式细胞术检测结果显示,NIH3T3 细胞与人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 结合率为 2.27%(图 5A),BxPC3 细胞与人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 结合率为 85.99%(图 5B)。

### 2.3.4 免疫荧光检测

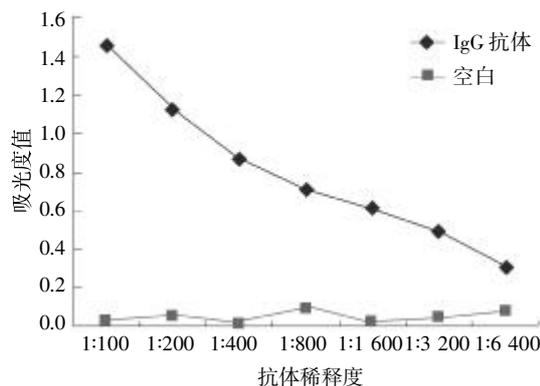
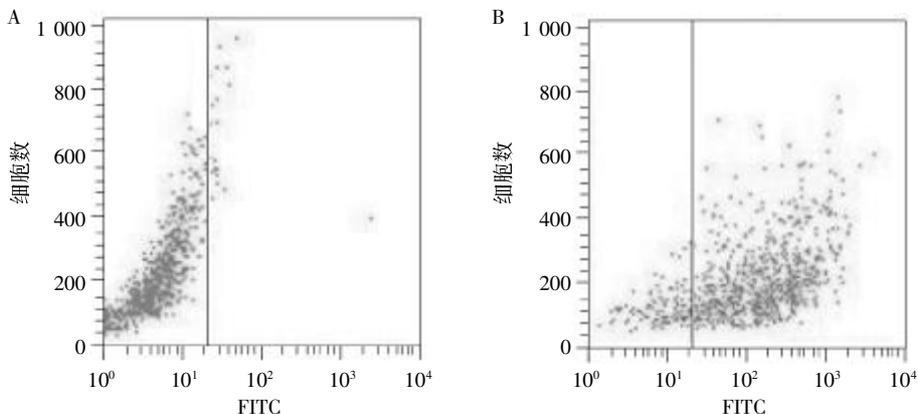


图 4 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 效价的检测

Figure 4 Analysis of antibody titer of human anti-TROP2 IgG antibody



A:NIH3T3 细胞;B:BxPC3 细胞。

图 5 人源抗 TROP2 抗体 IgG 和 BxPC3、NIH3T3 细胞结合的流式细胞检测

Figure 5 Fluorescence-activated cell sorter analysis:the combination of human anti-TROP2 IgG antibody and BxPC3,NIH3T3 cell lines

人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 作为一抗,罗丹明标记的抗人 Fab 作为二抗,在荧光显微镜下观察 TROP2 在人胰腺癌细胞 BxPC3 中的表达。如图 6 所示,可见人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 定位于细胞膜(绿色荧光),蓝色为 DAPI 染色细胞核。而阴性对照细胞 NIH3T3 基本没有绿色荧光信号。

#### 2.4 人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

MTT 检测结果与抑制率计算结果显示,抗体稀释度分别为 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80,作用 48 h,抗体对 BxPC3 细胞抑制率分别为 (75.81 ± 6.76)%、(50.38 ± 3.95)%、(41.41 ± 2.29)%、(27.35 ±

3.36)%、(15.29 ± 2.64)%,而对 NIH3T3 细胞的抑制率分别为 (6.14 ± 1.47)%、(5.97 ± 1.35)%、(3.14 ± 0.98)%、(2.75 ± 1.15)%、(5.50 ± 1.98)% (图 7)。经单因素方差分析,抗体对 BxPC3 细胞与 NIH3T3 细胞的抑制率比较,差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),表明人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 对 BxPC3 细胞的生长有明显抑制作用,而对 NIH3T3 细胞则基本无抑制作用。

抗体浓度与细胞生长抑制率经线性相关性分析,结果显示,对于 BxPC3 细胞,  $R^2 = 0.969 1$ ,而对于 NIH3T3 细胞,  $R^2 = 0.192 1$  (图 8),表明抗体稀释度与 BxPC3 细胞生长抑制率之间存在剂量依赖关系,而与 NIH3T3 细胞则无此关系。

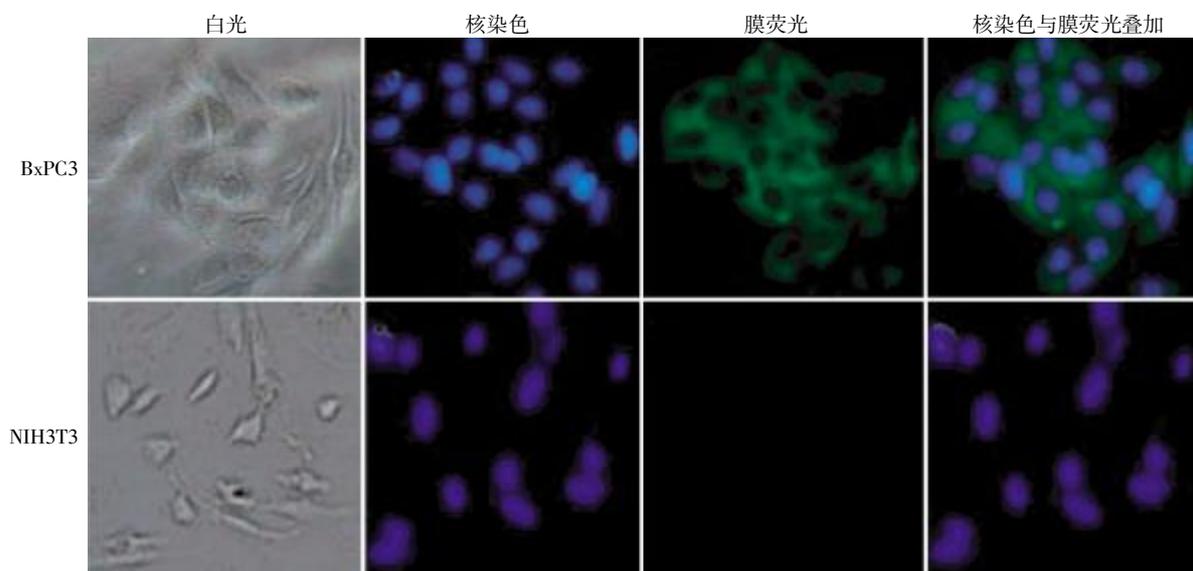


图 6 人源抗 TROP2 抗体 IgG 和 BxPC3、NIH3T3 细胞结合的免疫荧光检测

Figure 6 Immunofluorescence assay; the combination of human anti-TROP2 IgG antibody and BxPC3, NIH3T3 cell lines

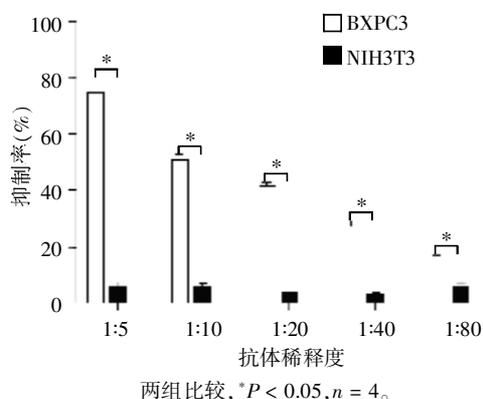


图 7 人源抗 TROP2 抗体 IgG 对 BxPC3、NIH3T3 细胞增殖的抑制作用

Figure 7 Inhibition assay of human anti-TROP2 IgG antibody in proliferation ability of BxPC3 and NIH3T3 cell lines

### 3 讨论

目前用于表达抗体及抗体片段有多个表达系统,包括原核表达系统(酵母、细菌等)和真核表达系统(哺乳动物细胞等),但各有其优缺点。细菌是最为成熟的表达平台,经常用于生产抗体片段,往往在很短时间内就可以获得大量表达产物,而且所需成本比较低廉。但同时也存在许多缺点:例如无法对表达水平及表达时间进行调控;原核表达系统翻译后加工修饰体系不完善,表达产物生物活性比较低;表达的抗体片段很有可能对宿主细胞产生毒害作用;不能组装完整的全分子抗体等<sup>[13-16]</sup>。相对而言,真核表达细胞有一套完整的合成、组装和分泌蛋白质的成

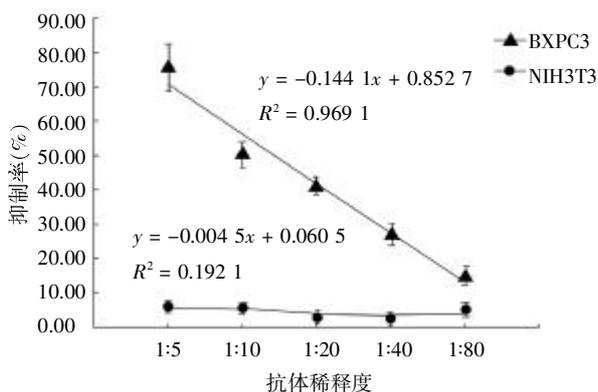


图 8 抗体稀释度与细胞生长抑制率间的相关性分析

Figure 8 The correlation analysis between the dilutability of antibody and the cell growth inhibition rate

分。与其他系统相比,真核表达细胞表达系统的优势在于能够指导抗体的正确折叠,提供复杂的糖基化、酰胺化、二硫键的正确连接,亚基的正确装配等多种翻译后加工功能,因而产生的抗体分子与天然蛋白质一样能形成链间二硫键,表达产物在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然抗体分子<sup>[17-21]</sup>。

研究发现小分子抗体(如 Fab 抗体)有免疫源性弱、分子量小及易到达病变组织的优点,但也有在体内停留时间较短,容易被清除及达不到理想效果等缺点。所以,目前有实验室致力于研究全分子抗体。这种抗体有很多优点:①因为抗体中鼠源性成分的减少降低了机体的免疫排斥反应;②亲和力较高,稳定性较好;③人源化抗体可以激活补体系统以及 Fc 受体介导的生物效应功能,对靶细胞具有杀伤作用;④在体内的半衰期长,人源化抗体可达数天有时甚至接近 21 d,其原因是人源化抗体中 Fc 段可以特异地结合人血管内皮细胞上的 Fc 受体(FcRn)而不被很快降解,又能随时释放到血液中参与循环。所以本实验室在已经研制出人源抗 TROP2 Fab 单克隆抗体的基础上,研制人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG<sup>[22-23]</sup>。

二氢叶酸还原酶(DHFR)/CHO 系统是目前最常用的哺乳动物表达系统,它是采用 dhfr 基因缺陷的中国仓鼠卵巢细胞株(Chinese hamster ovary cell, CHO),这种细胞不能合成四氢叶酸,而 DHFR 对于嘌呤的生物合成是必不可少,因此它只能在添加有胸苷、甘氨酸、嘌呤的培养基上才能生长,将含有 dhfr 基因和编码目的蛋白抗体基因的载体转染这种细胞,可以得到在不含上述添加剂的培养基中也能生长的工程细胞株。DHFR 的这种功能可被叶酸类

似物甲氨喋呤(methotrexate, MTX)抑制,不断提高 MTX 的浓度,选择抗 MTX 的细胞系,结果将得到 dhfr 基因大量扩增的细胞系,与此同时,随 dhfr 共转染的编码目的蛋白的基因序列也随之得到扩增,进而使目的蛋白表达量得到提高。一般认为, IgG 比 Fab 亲和力高,稳定性好,能够激活补体系统以及 Fc 受体介导的生物效应功能,因此在 CHO dhfr-细胞内真核表达了抗 TROP2 人源 IgG 抗体分子,获得了全分子抗体,更接近于天然抗体分子的构象。另一方面,抗 TROP2 人源 IgG 含有 Fc 段,可以与 Protein G 高亲和力结合,利用 Protein G 亲和柱进行纯化,方法简单,纯化效率与纯度均较高。

本实验成功构建了人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 的真核表达系统,纯化获得了人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG。SDS-PAGE、Western blot 检测可见抗体的重链和轻链分别为 55 000 与 28 000, ELISA 法检测抗体的效价,结果表明在 1:6 400 的稀释度时,抗体仍可较好地识别 TROP2 抗原,提示此抗体具有与 TROP2 蛋白结合的特异性且效价较高。流式细胞与免疫荧光实验中选用胰腺癌细胞 BxPC3 和纯化的人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 共同孵育,然后加 FITC 标记抗人 Fab 共孵育,结果表明此抗体能特异识别细胞表面 TROP2 蛋白。在 MTT 检测中,人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 与 BxPC3 细胞共同培养,结果表明此抗体对 BxPC3 细胞的增殖有明显抑制作用,且抗体浓度越高,细胞生长抑制率也明显增高。本研究结果表明在 CHO dhfr-细胞中成功构建了人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 真核表达系统,表达出了单克隆人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG,证明了此抗体可显著抑制胰腺癌细胞的生长。因此,人源抗 TROP2 全分子抗体 IgG 在胰腺癌分子靶向治疗方向有较好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Lau WY, Lai EC. Development and controversies of adjuvant therapy for pancreatic cancer[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008, 7(2): 121-125
- [2] Jiang Y, Liu M, Li Z, et al. Discovery of novel candidate oncogenes in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(128): 1825-1832
- [3] Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Translating discovery in zebrafish pancreatic development to human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutic [J]. Zebrafish, 2013, 10(2): 132-146

vation of  $\beta$ -catenin signaling [J]. *J Virol*, 2005, 79 (4): 2375-2382

[16] Fotheringham JA, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 effects on epithelial acinus development reveal distinct requirements for the PY and YEEA motifs [J]. *J Virol*, 2013, 87(24): 13803-13815

[17] 梁洁, 刘琼琼, 张慧林, 等. 抗人滋养层细胞表面抗原-2 单抗的制备及免疫学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(5): 645-646

[18] 吕洪臻, 唐小军, 熊四平, 等. 抗炭疽毒素保护性抗原单克隆抗体的制备及功能分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(11): 1497-1501

[19] Zhang D, Mao Y, Xiong L, et al. Characterization of human Fab antibody fragments specific to LMP1 (HLEAFab) in nasopharyngeal carcinoma for potential molecular diagnosis and therapeutic applications [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1694-1698

[20] Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody [J]. *J Exp Med*, 1929, 50(6): 809-823

[收稿日期] 2014-03-06

(上接第 869 页)

[4] Lin JC, Wu YY, Wu JY, et al. TROP2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signalling in lung adenocarcinoma [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(6): 472-485

[5] Bignotti E, Todeschini P, Calza S, et al. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(5): 944-953

[6] Fong D, Spizzo G, Gostner JM, et al. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. *Modern Pathol*, 2008, 21(2): 186-191

[7] Cubas R, Li M, Chen C, et al. Trop2: a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 309-314

[8] 郑媛媛. 肿瘤的单抗靶向疗法在国内的研究和应用进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(1): 70-73

[9] 王小英, 林红, 张慧林, 等. 人源抗 Trop-2 抗体 Fab 的制备及条件优化 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(1): 35-39

[10] 林红, 梁洁, 张慧林, 等. 人源抗滋养层细胞表面抗原-2 基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(10): 1101-1107

[11] 梁洁, 刘琼琼, 张慧林, 等. 抗人滋养层细胞表面抗原-2 单抗的制备及免疫学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(5): 645-650

[12] 朱洁, 王绮如. 单克隆抗体药物在肿瘤靶向治疗中的应用与展望 [J]. *中国医师杂志*, 2007, 9(7): 1006-1007

[13] Kodama Y, Suzuki H, Dohra H, et al. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 183

[14] Nguyen MT, Koo BK, Thi VTT, et al. Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth

hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89038

[15] Porowinska D, Wujak M, Roszek K, et al. Prokaryotic expression systems [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 119-129

[16] Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(21): 3613-3634

[17] 冯宝刚, 朱超, 王会, 等. 中国斗鸡 DJ-1 基因克隆与原核、真核表达研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(5): 70-74

[18] 向军俭, 童吉宇, 王宏. 抗体技术研究进展 (1): 人源抗体技术 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2012, 33(5): 524-530

[19] 于长明, 徐静, 童贻刚, 等. 人源抗-HAV 全分子抗体在 CHO 细胞中的表达 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(3): 176-181

[20] Wang D, Cui Y, Jiang Z, et al. Knockdown expression of eukaryotic initiation factor 5 C-terminal domain containing protein extends lifespan in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(2): 465-469

[21] Wang PL, Bao Y, Yee MC, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90859

[22] 贺江, 樊明涛, 梁颖, 等. 抗独特型抗体在小分子物质免疫检测中的应用 [J]. *分析化学*, 2010, 38(9): 1366-1370

[23] 孙逊, 肖冰, 张振书, 等. 小分子抗体在肿瘤诊治方面的应用 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2003, 18(1): 71-75

[收稿日期] 2014-03-17